

Miiko Jokipii

PROPROTEIINIKONVERTAASI FURIININ VAIKUTUS IHOHAAVAN PARANEMISEEN

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Helmikuu 2019

TIIVISTELMÄ

Miiko Jokipii: Proproteiinikonvertaasi furiinin vaikutus ihohaavan paranemiseen
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen lisensiaatin tutkinto
Helmikuu 2019

Furiini on proproteiinikonvertaasi, joka mm. aktivoi kudoksen paranemiseen vaikuttavan transformoivan kasvutekijän (TGF- β 1-molekyylin). Tässä tutkimuksessa selvitetään furiinin vaikutusta hiiren ihohaavan paranemiseen ns. konditionaalisen poistogeenisen (knock-out; KO) eläinmallin avulla. Tutkimuksessa vertailtiin ihohaavojen parantumista tavallisten (ns. ”villityyppi”; WT) ja makrofagi/neutrofiili spesifisten furiinipoistogeenisten (LysMCre-fur-KO) C57BL/6-hiirikannan hiirten välillä. Makroskooppista paranemista tutkittiin valokuvaamalla hiirille tehty haavat päivittäin kymmenen vuorokauden ajan ja vertaamalla haavojen pinta-alan pientymistä molemmilla genotyypeillä. Histologisesti haavoja arvioitiin mittaamalla tietokoneelle kuviksi skannatuista mikroskooppileikkeistä yksittäisten haavojen leveys, mahdollinen re-epitelisaation puutoksen leveys haavan pinnalla ja granulaatiokudoksen koko tarkasteltuna ajankohtana. Aineistossa on 39 hiirtä. Haavoista kerättiin kudospätkiä kolmena eri tarkasteluajankohtana, 7, 10 tai 14 päivää haavan leikkauksen jälkeen. Kerätyt kudospätkiä leikattiin haavojen kohdalta ja värjättiin histologisen paranemisen tutkimiseksi.

Haavoista otettujen valokuvien perusteella paranemisnopeudessa ei ole eroa makrofagi/neutrofiili spesifisten furiinipoistogeenisten ja villityypin hiirten välillä. Myöskään histologisissa määrityksissä ei löytynyt merkittäviä eroja paranemisnopeudessa genotyyppien välillä, mutta havaitsimme kuitenkin, että furiinipoistogeenisten hiirten haavat saattoivat revetä uudelleen auki paranemisprosessin loppupuolella. Tätä ei villityypin hiirillä havaittu. Furiini siis voi vaikuttaa haavan paranemiseen estäen haavan repeämistä.

Avainsanat: furiini, proproteiinikonvertaasi, ihohaava

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYS

JOHDANTO	1
MATERIAALIT JA MENETELMÄT	5
Hiiret	5
Leikkausmenetelmä	6
Tilastolliset menetelmät	7
TULOKSET	8
Haavojen pinta-alojen vertailu valokuvista	8
Histologiset määritykset	10
Re-epitelisaation puutos ja haavan repeäminen	10
Haavan leveys ja granulaatiokudoksen koko	12
POHDINTA	15
LÄHDELUETTELO	17

JOHDANTO

Haavan paraneminen on yksi monimutkaisimmista biologisista prosesseista, joita ihmiselimistössä tapahtuu sen eliniän aikana. Haavoittuessa elimistössä käynnistyy useita koordinoituja tapahtumaketjuja, jotka tähtäävät kudoksen paranemiseen. Aktivoituneet tapahtumaketjut ovat sekä solujen sisäisiä että solujen välisiä. Monien eri solutyyppeiden pitää reagoida ja muuttua haavan paranemiseksi. Haavan parantuessa aikuisella ihmisellä lopputuloksena on yleensä sidekudoksinen arpi, jolla ei ole kudoksen normaali toimintoja. Sitä vastoin vaurioitunut alkion kudoks raskauden alkuaikoina voi uudistua alkuperäistä kudosta vastaavaksi ja säilyttää toiminnollisuutensa, välttämättä toimimattomaksi sidekudokseksi muuttumisen. Ihminen menettää tämän kudoksen uusiutumiskyvyn iän myötä (1). Arpeutumalla tapahtuvaa paranemista tapahtuu melkein kaikissa kudoksissa melkein mille tahansa vauriota aiheuttavalle tekijälle altistumisen jälkeen. Sydänlihaksen vaurioituminen hapenpuutteen vuoksi sydäninfarktissa käynnistää huomattavan paljon samaa muistuttavan prosessin vaurioituneessa kudoksessa, kuin esimerkiksi sormen iholla käynnistytävä tapahtumaketju paperiviillon jälkeen (2).

Iho jaetaan keratinosyyteistä, karvafollikkeleista ja hikirauhasista koostuvaan epidermikseen, joka on ihon pinnallisin kerros, sekä sen alapuolella olevaan dermikseen. Dermis on monimuotoinen kudoks, joka koostuu muun muassa fibroblasteista, solunulkoisesta väliaineesta, hermoista sekä verija imusuonista. Epidermiksen ja dermoksen välissä on sidekudoksinen tyvikalvo. Ihon haavoittuessa riittävän syvältä, vaurioituu sekä epidermis että dermis, mutta myös yksittäiset solut. Vaurioitumista seuraavassa haavan paranemisessa voidaan erottaa toistensa kanssa lomittain sijoittuvia vaiheita: välitön vaste vaurioon, tulehdusvaihe, uudelleenmuodostumisvaihe ja kypsymisvaihe. (3)

Välittömään vasteeseen kuuluu veren hyytymisen. Verisuonen seinämän vaurioituneet endoteelisolut vapauttavat välittäjäaineita ja saavat verisuonet supistumaan paikallisesti. Verihiutaleet aktivoituvat joutuessaan kosketuksiin vaurioituneen endoteelisolukon alta paljastuvan

kollageenin kanssa ja kertyvät suonen vaurioituneisiin kohtiin. Kudosvaurion ja aktivoituneiden verihiutaleiden takia moniportaisen hyytymiskaskadin lopputuloksena verenkierron liukoisesta fibrinogeenistä muodostuu liukenematonta fibriiniä. Fibriinisäikeet takertuvat toisiinsa muodostaen verkkomaisen rakenteen. Fibriiniverkko toimii verenvuotoa estävänä tulppana sekä pintana, johon kasvutekijät voivat tarttua kiinni ja jota pitkin välittäjäaineiden paikalle houkuttelemat solut voivat ryömiä (4). Aktivoituneet verihiutaleet ovat tärkeä kasvutekijöiden, kuten TGF- β :n (transforming growth factor- β) lähde (5). Vapauttamiensa aineiden avulla ne edistävät verisuonten uudelleenmuodostusta sekä keratinosyyttien ja fibroblastien paikalle vaeltamista. Myös kudokseen vuotanut seerumi eli veren nestemäinen osa sisältää useita välittäjäaineita, jotka muuttavat paikallisesti solujen maineenvaihduntaa ja säätelevät solujen ilmentämiä geenejä.

Tulehdusvaihe kestää 1-4 päivää ja alkaa myös heti kudoksen vaurioituttua, kun verenkierrossa kiertävät valkosolut, pääasiassa neutrofiilit, vuotavat vahingoittuneesta verisuonesta kudokseen. Vaurioitumishetkellä paikallisesti kudoksessa jo valmiiksi sijainneet immuunisolut, kuten mast-solut sekä $\gamma\delta$ -T-solut, aktivoituvat nopeasti ja vapauttavat sekä kemokiineja että sytokiineja. Neutrofiilit erittävät kasvutekijöitä ja sytokiineja, jotka voimistavat tulehdusreaktiota. Neutrofiilien jälkeen paikalle saapuvat monosyytit kasvutekijöiden houkuttelemina. Monosyytit erilaistuvat makrofageiksi ja fagosytoivat taudinaiheuttajia sekä tuhoutuneita soluja. Verisuonten endoteelisolut havaitsevat erilaiset vapautuneet välittäjäaineet, mikä laukaisee endoteelisolut tuottamaan selektiinejä. Selektiinit säätelevät valkosolujen tarrautumista verisuonten seinämään sekä valkosolujen siirtymistä verisuonten endoteelisolukon läpi (6). Siirtymistä helpottaa verisuonten laajeneminen sekä suonen seinämän läpäisevyyden lisääntyminen muun muassa tulehdukseen liittyvän typpioksidin, verisuonikasvutekijän (VEGF) ja vaurioituneista soluista vapautuvan histamiinin vuoksi. Kliinisesti tulehdusvaihe näkyy ihohaavassa punoituksena, kuumotuksena, turvotuksena ja tuntuu kipuna.

Tulehdusvaiheeseen luetaan kuuluvaksi myös angiogeneesi ja lymfangiogeneesi eli uusien verisuonten ja imusuonten muodostuminen, mikä on elintärkeää kudoksen paranemiseksi. Uusien suonten muodostumista säätelevät monet vaurioituneen kudoksen solujen vapauttamat sytokiinit. Haavan läheisyydessä olevat veri- ja imusuonet alkavat ikään kuin kasvattaa juuria vaurioitunutta aluetta kohti sytokiinien välittämien viestien ohjaamana. Muutaman päivän kuluttua vauriosta

haava-alue onkin tiheän mikroskooppisen pienen verisuoniverkoston kattama (7). Tiheä verisuoniverkosto tuo paranevalle kudokselle enemmän tarvittavia ravinteita ja happea. Uudet pienet imusuonet sekä korjatut vanhat imusuonet toimivat viemäriputkina ja poistavat vaurioalueelle kertyneen ylimääräisen kudokseen vuotaneen nesteen, jolloin turvotus helpottaa.

Uudelleenmuodostumisvaihe kestää 4-24 päivää. Kestoon vaikuttaa hyvin paljon vaurioitunut kudostyyppi, sen sijainti, ikä ja elinkyky sekä vaurion koko. Lapsen pieni viiltohaava varpaassa paranee huomattavasti nopeammin kuin ikääntyneen diabetesta sairastavan vanhuksen vastaava haava, joka ei välttämättä parane ollenkaan, jos ravinteita ja happea ei haava-alueelle saada kuljetettua tarpeeksi. Välittömän vasteen aikana muodostunut fibriiniverkko ja siihen kiinnittyneet solut toimivat vain väliaikaisena paikkana, joka estää veren valumisen pois kehosta sekä bakteerien ja muiden taudinaiheuttajien pääsyn elimistöön. Uudelleenmuodostumisvaiheen aikana haava-alueen solut pyrkivät sulkemaan haavan lopullisesti ja palauttamaan menetetyn kudoksen.

Syvän ihohaavan pitää parantua niin pinnalta kuin syvemmältäkin. Ihon pinnan uudelleen epitelisoituminen keratinosyyteillä tapahtuu läheisten solujen jakatumisen ja vaeltamisen myötä (8). Vaeltavat solut lisäävät MMP (matrix metalloproteinase)-tuotantoaan, jonka myötä ne pystyvät pilkkomaan soluväliaineen proteiineja ja ikään kuin kairaamaan itselleen kulkuväylää terveeseen kudoksen puolelta väliaikaisen kudospaikan sisään kohti haavaa. Uusiutuva epidermis houkuttelee läheisyydestään paikalle myös ihon uusiutumiskykyisiä kantasoluja, jotka erilaistuvat tarvittaviksi epidermisen soluiksi ja vaeltavat paikalle (9).

Uudelleenmuodostumisvaiheessa syntyy uutta fibroblastien tuottamaa granulaatiokudosta korvaamaan paranemisen alussa muodostunut fibriinisäikeistä ja niihin kiinnittyneistä soluista koostuva paikka. Haavan läheisyydessä olevat fibroblastit reagoivat vaurioon tuottamalla heikosti supistumiskykyisiä aktiinisäiekimppuja. Säiekimppujen supistumiskyky kasvaa huomattavasti, kun fibroblastit ympärillä vallitsevien olosuhteiden (kasvutekijät kuten TGF- β 1, solunulkoinen väliaine, mekaaninen stressi) ohjaamina erilaistuvat myofibroblasteiksi (10). Myofibroblastit pystyvät tuottamaan lihassoluistakin löytyviä hyvin supistumiskykyisiä α -aktiinisäikeitä.

Supistumiskykyisten säikeiden avulla fibroblastit ja myofibroblastit kurovat haavan reunoja

lähemmäksi toisiaan pienentäen haava-aluetta. Supistumiskykyisten säikeiden tuottamisen lisäksi nämä solut osallistuvat tuottamaan, liittämään toisiinsa ja järjestämään kollageenisäikeitä oikealla tavalla lopullisen paikan eli arven muodostamiseksi.

Viimeisenä erilliseksi luokiteltuna vaiheena pidetään kypsymisvaihetta. Se kestää viikoista yhteen vuoteen tai jopa pidempään. Kypsymisvaiheen aikana kaikki haavan paranemiseen tähtäävät aineenvaihdunnan muutokset hiljenevät ja sammuvat sekä tulehdus rauhoittuu. Vielä ei tarkkaan tiedetä, millä eri tavoin säätely tapahtuu, mutta oma osansa on ainakin solujen välisillä keskinäisillä kontakteilla sekä eri välittäjäainella, kuten glukokortikosteroideilla, jotka eri palautesäätelyketjujen kautta jarruttavat uuden kudoksen tuottamista sekä tulehdusta ylläpitävää prosessia. Suurin osa endoteelisoluista, neutrofiileista, makrofageista ja myofibroblasteista häviää haava-alueelta ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin kautta tai poistumalla veri- ja imusuonia pitkin. Jäljelle jäävä arpi sisältää vain vähän soluja, mutta paljon proteiinipitoista solunulkoista väliainetta kuten kollageenia. Kuukausien kuluessa MMP:t korvaavat kollageeni III:n kollageeni I:llä, lisäävät kollageenien välisiä sidoksia ja hajottavat ylimääräiset kollageenisäikeet. Tämä pienentää arpea ja lisää sen biomekaanista lujuutta. Arpikudos ei kuitenkaan koskaan saavuta sitä kestävyyttä, joka haavoittumattomalla kudoksella oli. Tulehdusvaiheen aikana alueelle luotu runsas verisuonitus muuttuu kypsymisvaiheessa solujen aineenvaihdunnan hiljentyessä paremmin tarkoitustaan palvelevaksi verisuonten verkostoksi, josta ylimääräiset verisuonet karsiutuvat ja häviävät. Vaikka haava on mennyt umpeen, ei kudoksen toiminnollisuus kuitenkaan palaa ennalleen. Paraneminen ei siis ole täydellistä. Esimerkiksi iholle muodostuvaan arpeen ei synny uusia karvatuppia eikä talirauhasia. (3)

Nisäkkäillä on kolmea eri muotoa transformoivasta kasvutekijä β 1. TGF- β -molekyylistä. Nämä ovat yksinkertaisesti nimetty TGF- β 1, TGF- β 2 ja TGF- β 3 ja ne ovat tärkeässä osassa solun kasvun ja erilaistumisen säätelyssä. (11, 12, 13) TGF- β 1 on näistä eniten tutkittu ja sitä pidetään luonnollisena immuuni- ja inflammaatioreaktioiden hillitsijänä (14, 15). TGF- β 1:ä tuotetaan kaikissa valkosolulinjoissa ja tuotettu määrä vaikuttaa immuunijärjestelmän aktiivisuuteen sekä immuunisolujen jakautumiseen ja erilaistumiseen (16). Todisteita TGF- β 1:n roolista immuunijärjestelmän ja inflammaation hillitsijänä on saatu TGF- β 1-puutteisilta hiiriltä, jotka kehittivät usean elimen tulehduksellisen sairauden, jonka vuoksi hiiret kuolivat 3-5 viikossa (17).

Vastaavasti liian suurina määrinä tuotettu aktiivinen TGF- β 1 johtaa immuunijärjestelmän häiriöihin aiheuttaen pahanlaatuisia kasvaimia, lisääntyneen alttiuden opportunistisille infektioille sekä liiallisen sidekudoksen tuoton, jota nähdään kroonisissa tulehduksellisissa sairauksissa (15). TGF- β 1 on tärkeä kohde lääketieteellisten hoitojen näkökulmasta, koska se vaikuttaa niin monissa elimistön haitallisissa tapahtumissa. Paranevassa haavassa TGF- β 1 tuottaa sidekudoksista arven. Täten lääkemolekyylit, jotka estävät TGF- β 1 toimintaa, ovat kiivaan tutkimuksen kohteena arven muodostusta estävinä lääkeaineina.

Soluvälitteiseen immunitettiin liittyy muun muassa makrofagien aktivaatio ja infektoituneiden solujen tuhoaminen. Jotta soluvälitteinen immunitetti toimisi, pitää viestiä eteenpäin välittävät proteiinit pilkkoa oikealla tavalla proteiinien esiasteista. Tätä pilkkomista katalysoivat PCSK-entsyymit (proproteini convertase subtilisin/kexin) (18). Furiini on yksi PCSK-entsyymiperheen proproteini konvertaasi, joka pilkkoo proteiinien esiasteita biologisesti aktiiviseen muotoon. Furiinia tuotetaan kudoksissa laajalti ja se on ensimmäinen löydetty ja myös eniten tutkittu PCSK-entsyymi (19). Furiinia tuotetaan muun muassa luuytimen monosyyteissä, jotka erilaistuvat makrofageiksi siirtyessään verenkierrosta kudoksiin. Furiinin tärkeimpiin tehtäviin kuuluu inaktiivisen pro-TGF- β 1:n aktivoiminen proteolyttisesti (20). Furiinilla on kuitenkin myös monia muita kohdeproteiineja, kuten edellä mainitut MMP sekä VEGF perheiden proteiinit (19).

MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Hiiret

Tutkimusaineistona on täysikasvuiset leikkaushetkellä pääsääntöisesti 8 viikon ikäiset ja 20-30 gramman painoiset uroshiiret. Kaikki eläinkokeissa käytetyt hiiret olivat C57BL/6 –kantaa. Tässä

tutkimuksessa furiinipoistogeenisillä hiirillä tarkoitetaan hiiriä, joilta furiinia tuottava geeni on poistettu lysotsyymi M – positiivisista soluista, tarkoittaen aktivoituneita makrofageja ja granulosityttejä (LysMCre-fur-KO). Kudosspesifinen furiinipoistogeenisyys saatiin aikaan käyttämällä aiemmin kuvattua menetelmää (21). Aineistossa oli 39 hiirtä, joista 17 hiirtä olivat genotyypiltään furiinipoistogeenisiä ja 22 villityyppiä, jotka toimivat kontrolleina. Yksi villityypin hiiri jouduttiin tutkimuksen aikana lopettamaan ja jättämään ulkopuolelle tutkimuksesta, koska se oli tippunut eläintenhoitajan käsittelyssä lattialle ja halvaantunut. Hiiriä käsiteltiin ja hoidettiin kansainvälisiä sopimuksia ja suosituksia noudattaen. Tutkimustyö suoritettiin Tampereen yliopiston lääketieteen yksikössä. Tutkimuksella on Etelä-Suomen Aluehallintoviraston myöntämä koe-eläinlupa (ESAVI/6330/04.10.07/2013).

Leikkausmenetelmä

Hiiret nukutettiin käyttämällä sevofluraani-anestesiakaasua. Hiirten turkki ajeltiin, iho desinfioitiin 70-prosenttisella etanolilla ja selän iholle leikattiin 6 mm kokoinen pyöreä haava käyttämällä instrumenttina Biopsy Punch™ 6 mm terää. Apuna ihopalan irrottamisessa käytettiin kirurgisia saksia, joilla leikattiin instrumentin jättämän pyöreän haavan äärirajoja mukailten ihopala irti. Tämä pyrittiin tekemään mahdollisimman tarkkaan, jotta haavat olisivat vertailukelpoisia. Pelkällä biopsiainstrumentilla tehtynä terää olisi pitänyt painaa niin kovaa hiiren ihoa vasten, että se olisi vaurioittanut myös ihon alla olevaa lihaskudosta. Haluttu haava ulottui kaikkien ihon kerrosten läpi lihaskalvolle asti. Haavat tehtiin symmetrisesti pareittain selkärangan molemmille puolille ja toimenpidettä tehdessä pyrittiin olla venyttämättä ihoa. Ihon palat poistettiin tarvittaessa atuloita ja kirurgisia saksia apuna käyttäen ja hiirille annettiin kipulääkkeeksi buprenorfiini-pistos (Vetergesic™) ihonalaisesti vatsanahkaan. Tarvittaessa eläinlaboratorion henkilökunta jatkoi kipulääkitystä seuraavina päivinä, jos hiiri söi huonosti tai käytös vaikutti vetäytyvältä.

Hiirten haavojen paranemista seurattiin päivittäin 1-21 vuorokauden ajan, jolloin haavat valokuvattiin. Valokuvausta varten hiiret nukutettiin joka kerta uudelleen sevofluraanilla. Hiiren viereen aseteltiin hiiren tunnistetiedot, tieto leikkauksen jälkeisestä päivästä ja mittaneliö. Mittaneliötä käytettiin apuna haavan koon määrittämisessä, koska riippumatta kuvausetaisyydestä

haavan ja mittaneliön pinta-alojen suhde pysyy aina samana ja näin eri valokuvista tehdyt määritykset ovat vertailukelpoisia. Valokuvista mitattiin mittaneliön sekä haavojen pinta-ala pikseleinä käyttämällä ImageJ®-ohjelmistoa (NIH, Bethesda, Yhdysvallat).

Hiiret lopetettiin ryhmästä riippuen 7, 10 tai 14 vuorokauden kuluttua hiilidioksidinarkoosilla. Lopettamisen jälkeen hiirten kaikki haavat leikattiin yhtenä iho- ja ihonalaiskudospalana veitsellä näytteeksi. Kudosnäyte fiksoitiin 4 % paraformaldehydissä 4-asteisessa jääkaapissa yön yli. Tämän jälkeen kudosnäytteet huuhdeltiin pitämällä niitä 30 minuuttia 1 % PBS-liuoksessa (phosphate buffered saline). Huuhtelun jälkeen haavat halkaistiin keskisagittaalitason leikkeiden saamiseksi. Haavapuoliskot aseteltiin muotteihin ja laitettiin 70 % etanoliliuokseen 4 asteiseen jääkaappiin odottamaan parafiiniin valamista. Haavanäytteistä tehtiin leikkeet, jotka värjättiin hematoksyliini-eosiini- tai Masson Trichrome –värjäyksellä, kuvattiin ScanScope XT® -näytelasiskannerilla ja siirrettiin elektroniseen muotoon.

Näistä kuvista määritettiin Image Scope viewer® -ohjelmalla re-epitelisaation puute, haavan leveys ja haavan koko. Lisäksi skannatuista kuvista arvioitiin oliko haava revennyt seurantajakson loppupuolella, sillä vain näissä revenneiksi havaituissa haavoissa oli re-epitelisaation puutetta vielä 10. ja 14. päivän kohdalla. Revenneistä haavoista muodostettiin erillinen tarkasteluryhmä LysMCreRe-R (LysMCreRe-Ruptured), sillä kaikki revenneet haavat olivat furinipoistogeenisillä hiirillä. Repeämättömien KO-hiirten haavojen tarkasteluryhmä on 10 ja 14 päivien määrittelyssä nimetty LysMCreC (LysMCreClosed).

Tilastolliset menetelmät

Leikkaus- ja värjäystulosten ollessa hyviä, haavasta määritettiin mahdollisimman monta tutkituista parametreista. Kaikki määritykset valokuvista ja kudosnäytteistä kirjattiin Excel® -taulukko-ohjelmaan. Taulukot siirrettiin tilastollista vertailua varten SPSS16® -tilasto-ohjelmaan. Histologisessa vertailussa kahden ryhmän eroja verrattiin kahden otoksen t-testillä ja vastaavasti kolmen ryhmän välisiä eroja yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Kuvaajat tehtiin Excel® -ohjelmalla ja kuvat muokattiin PowerPoint® -ohjelmalla.

TULOKSET

Haavojen pinta-alojen vertailu valokuvista

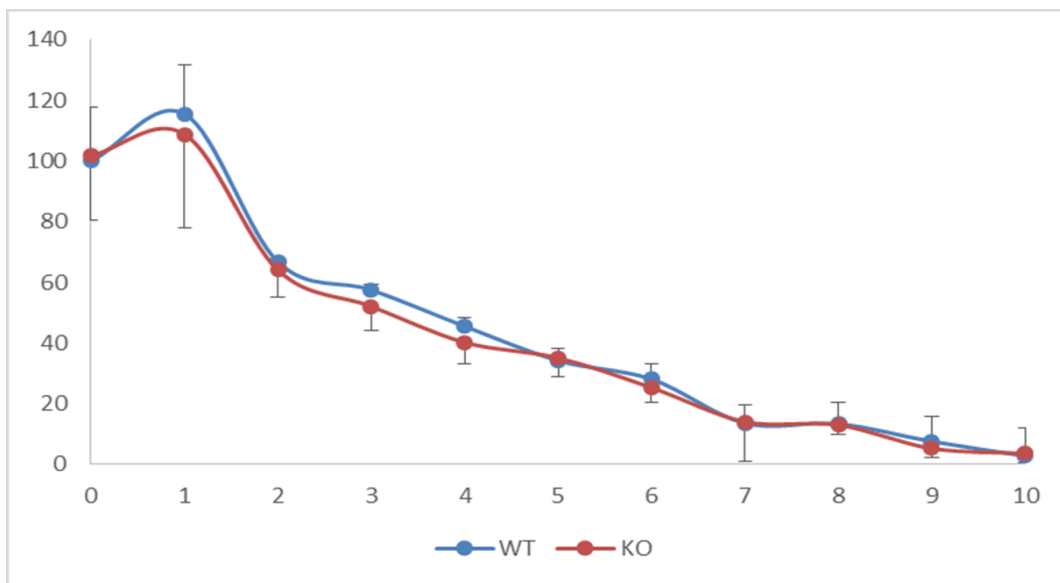
Hiirten lopetuspäivänä otetuista valokuvista tehtyjen makroskooppisten määritysten perusteella voidaan todeta, että genotyypiltään furiinipoistogeenisten hiirten haavat sulkeutuvat samaa tahtia kuin genotyypiltään villityyppejä olevien hiirten haavat. Valokuvaamalla hiirten haavojen sulkeutumista seurattiin 10 vuorokauden ajan. Tämän jälkeen valokuvista oli liian hankalaa erottaa haavan todellista kokoa ja arvioida, onko haava edelleen auki vai jo täysin sulkeutunut. Tämän takia haavojen paranemista ei seurattu esimerkiksi 14:ä vuorokautta kuten tehtiin histologisia määrittämyksiä varten.

Pinta-alojen vertailussa eri päivien välillä ei käytetty haavan pinta-alan absoluuttisia arvoja vaan haavaa verrattiin leikkauspäivän haavaan siten, että leikkauspäivän haavan pinta-alalle annettiin arvoksi 100 %. Villityyppien haavat suurensivat keskimäärin 15,5 % ja KO-haavat keskimäärin 8,8 % ensimmäisen vuorokauden aikana. Kahden vuorokauden jälkeen operaatiosta WT-haavat olivat keskimäärin 33,3 % ja KO-haavat 36,0 % pienempiä kuin alkuperäinen tehty haava. Molemmissa ryhmissä haavat sulkeutuivat tasaiseen tahtiin eikä ryhmien välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa.

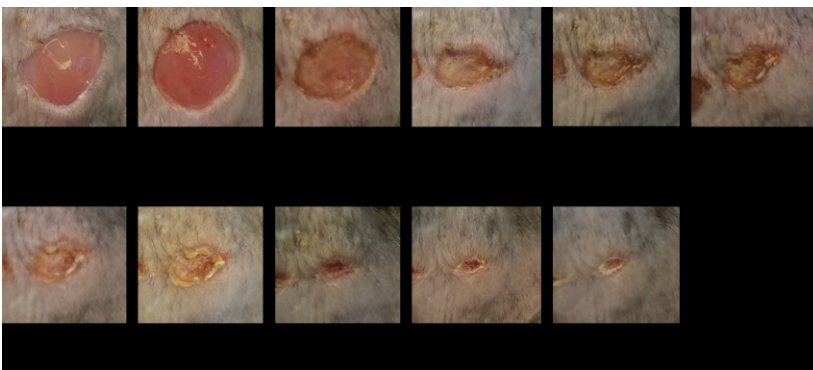
Keskiarvo kaikkien määritettyjen villityypin haavojen pinta-alasta kymmenennen vuorokauden kohdalla oli 2,8 % alkuperäisten haavojen keskiarvojen koosta. Kaksi haavaa jätettiin osaksi määrittämyksen ulkopuolelle, koska ne alkoivat tuntemattomasta syystä suurentua seurannassa. Haavoituksen jälkeen haava-alue alkoi parantua tavanomaisesti, mutta ihovaurio alkoi leviää haavan reunalta kurottuen terveeseen kudokseen päin, tehden haavasta leviävän ja epämuodostuneen. Tämä vaikeutti aiheutetun haavan pinta-alan määrittämistä valokuvasta, joten näiden haavojen pinta-ala jätettiin määrittämättä siitä päivästä lähtien, kun haava katsottiin poikkeavaksi. Toinen haavoista oli

poikkeava päivät 4–10 ja toinen päivät 7–10.

Keskiarvo kaikkien furiinipoistogeenisten haavojen pinta-alasta kymmenentenä päivänä oli 3,6 % alkuperäisiin haavoihin verrattuna. Furiinipoistogeenisillä hiirillä havaittiin yksi makroskooppisesti epämuodostunut haava neljäntenä leikkauksen jälkeisenä päivänä. Tämä haava oli ulkona pinta-alan määrittämisestä neljännessä päivästä lähtien.



Kuva 1. Valokuvista määritettyjen haavojen koon keskiarvo verrattuna alkuperäisten tehtyjen haavojen koon keskiarvoon prosentteina ilmaistuna. Pystyakselilla on prosentit ja vaaka-akselilla koon määrittämisajan ajankohta päivinä. Haavojen lukumäärät: WT n = 28, KO n = 18.

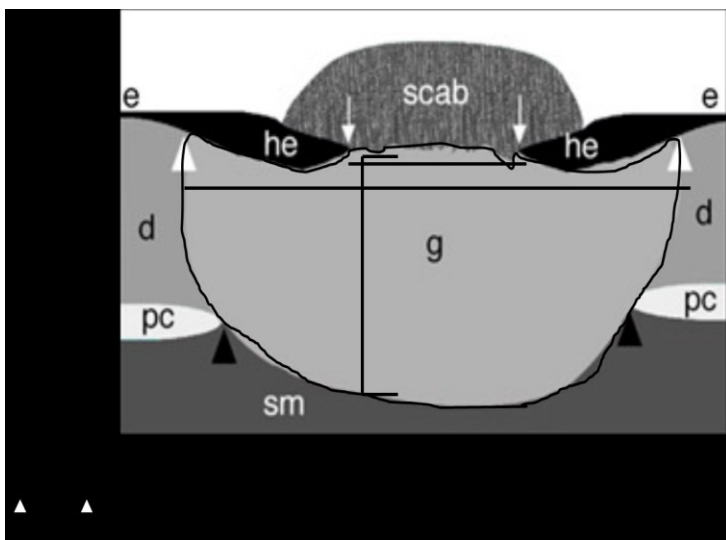


Kuva 2. Havainnekuva yhden furiinipoistogeenisen hiiren haavan paranemisen kulusta.

Histologiset määritykset

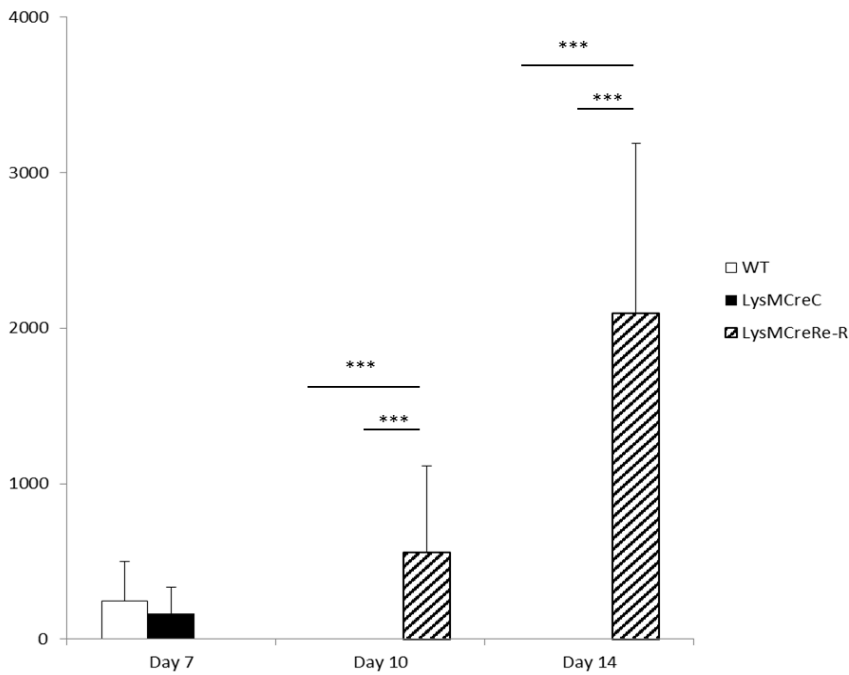
Re-epitelisaation puutos ja haavan repeäminen

Villityypin hiirten haavat ovat ryhmää WT. Furiinipoistogeeniset revenneet haavat muodostavat ryhmän LysMCreRe-R ja loput repeämättömät furiinipoistogeeniset haavat ovat ryhmää LysMCreC. Seitsemän vuorokauden kohdalla ei ollut vielä revenneitä haavoja histologisesti arvioituna. Re-epitelisaation puutos 7 vuorokauden kohdalla oli (keskiarvo; keskihajonta) 245 μm ; 256,1 μm villityypin hiirten haavoissa ja 163 μm ; 172,0 μm furiinipoistogeenisillä. 10 vuorokauden kohdalla kaikki repeämättömät haavat olivat täysin re-epitelisoituneet. Furiinipoistogeenisten hiirten revenneiden haavojen re-epitelisaation puutos oli 558 μm ; 558 μm . 14 vuorokauden kohdalla furiinipoistogeenisten hiirten revenneiden haavojen re-epitelisaation puutos oli 2 096 μm ; 1 094 μm . Vain revenneissä haavoissa oli re-epitelisaation puutos 10. ja 14. vuorokauden kohdalla. Villityypin hiirten haavat eivät revenneet vastaavalla tavalla tutkimuksen aikana.



Kuva 3. Histologisia parametreja haavan paranemisen arvioimiseen

7. vuorokauden kohdalla WT ja LysMCreC ryhmät eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,437$) re-epitelisaation puutoksen suhteen. 10. vuorokauden kohdalla ryhmät erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p<0,001$), mutta ainoastaan verrattaessa revennyttä LysMCreRe-R ryhmää WT ja LysMCreC ryhmiin ($p<0,001$ ja $p<0,001$). Myös 14. vuorokauden kohdalla ryhmät erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p<0,001$). Revennyt LysMCreRe-R ryhmä poikkesi sekä WT että LysMCreC ryhmistä merkitsevästi ($p<0,001$ ja $p<0,001$).

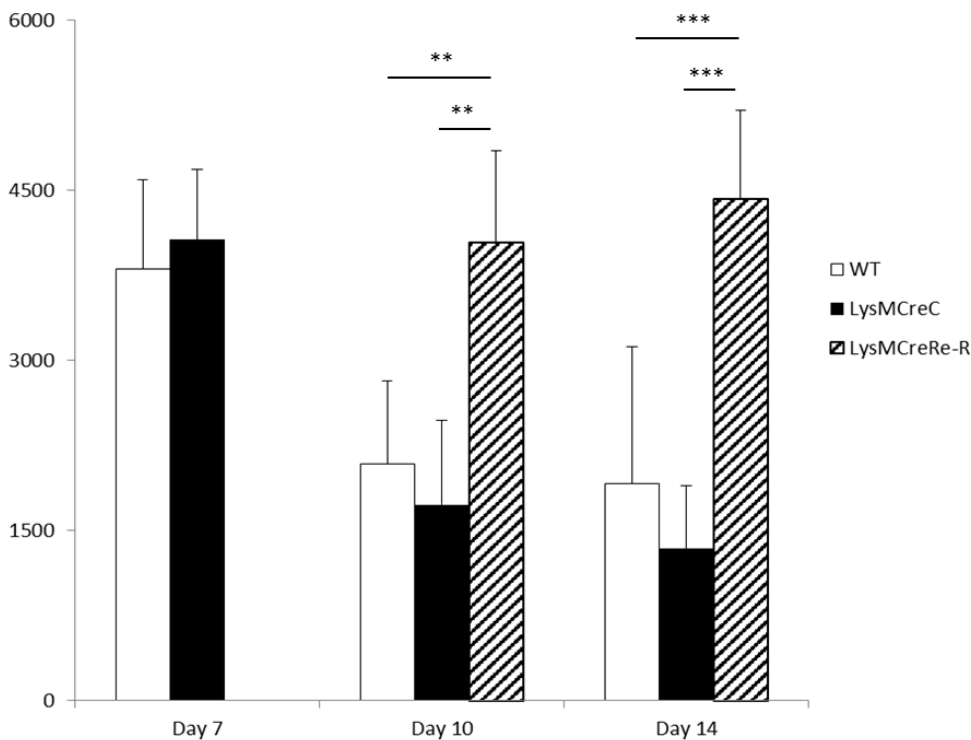


Kuva 4. Haavojen re-epitelisaation puutos (μm) eri tarkasteluajankohtina (päivä). Haavojen lukumäärät: Day 7: WT $n = 8$, LysMCreC $n = 12$; Day 10: WT $n = 21$, LysMCreC $n = 8$, LysMCreRe-R $n = 2$; Day 14: WT $n = 17$, LysMCreC $n = 11$, LysMCreRe-R $n = 5$. *** = $p<0,001$

Haavan leveys ja granulaatiokudoksen koko

Haavojen leveydet olivat 7. vuorokauden kohdalla (keskiarvo; keskihajonta) 1 901 μm ; 395 μm WT-ryhmässä ja 2 031 μm ; 313 μm LysMCreC ryhmässä, 10. vuorokauden kohdalla 2 089 μm ; 734 μm (WT), 1 730 μm ; 745 μm (LysMCreC) ja 4 034 μm ; 814 μm (LysMCreRe-R). 14. vuorokauden kohdalla haavojen leveydet olivat 1 910 μm ; 1 211 μm (WT), 1 342 μm ; 555 μm (LysMCreC) ja 4 422 μm ; 783 μm (LysMCreRe-R).

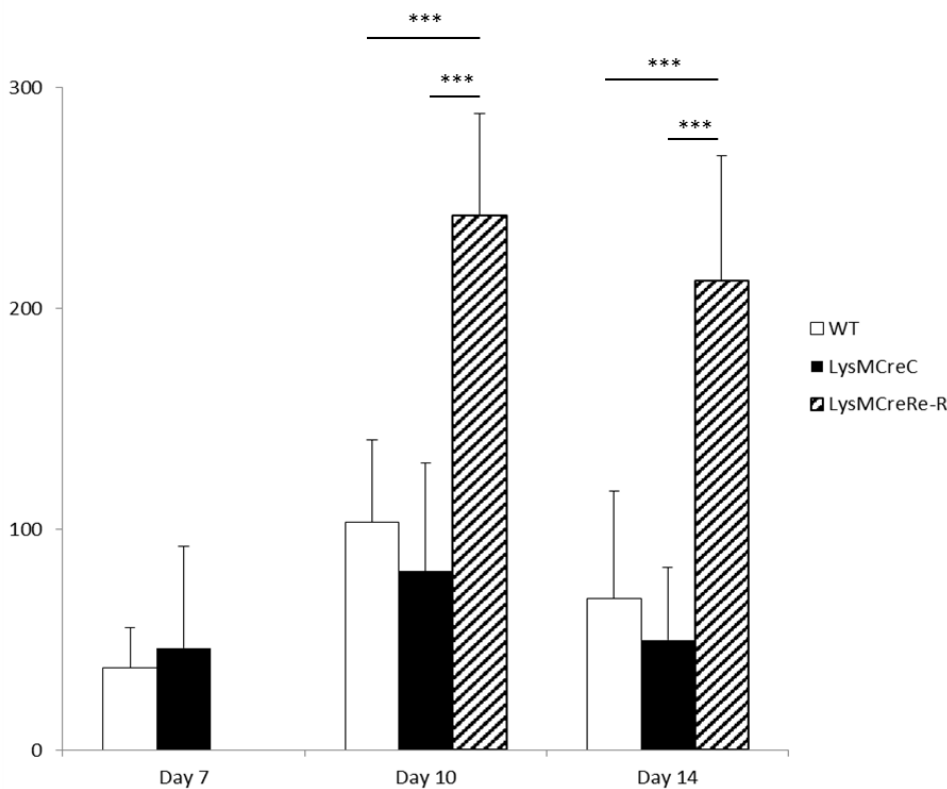
7. vuorokauden kohdalla WT ja LysMCreC ryhmien haavojen leveydet eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,466$). 10. vuorokauden kohdalla ryhmät erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p=0,03$), mutta ainoastaan verrattaessa revennyttä ryhmää WT ja LysMCreC ryhmiin ($p=0,006$ ja $p=0,002$). Myös 14. vuorokauden kohdalla ryhmät erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p<0,001$). Revenneiden haavojen ryhmä poikkesi sekä WT että LysMCreC ryhmistä ($p<0,001$ ja $p<0,001$).



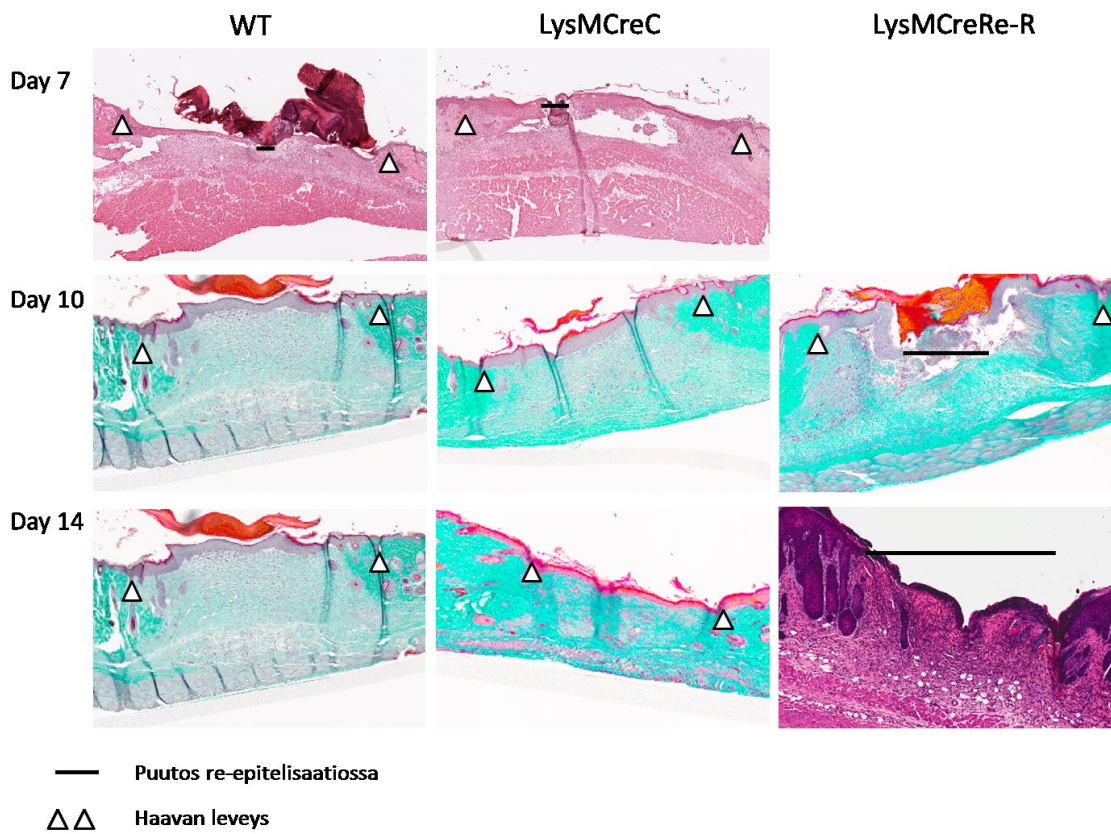
Kuva 5. Haavojen leveyksien (μm) keskiarvot eri tarkasteluryhmissä eri ajankohtina (päivä). ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$

Haavoihin muodostuneen granulaatiokudosten koko ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$) oli 7. vuorokauden kohdalla (keskiarvo; keskihajonta) 37,2; 18,4 (WT) ja 46,2; 21,6 (LysMCreC), 10. vuorokauden kohdalla 103,1; 37,2 (WT), 80,9; 48,9 (LysMCreC) ja 242,1; 46,0 (LysMCreRe-R) sekä 14. vuorokauden kohdalla 68,5; 48,6 (WT), 49,8; 32,8 (LysMCreC) ja 212,6; 56,6 (LysMCreRe-R).

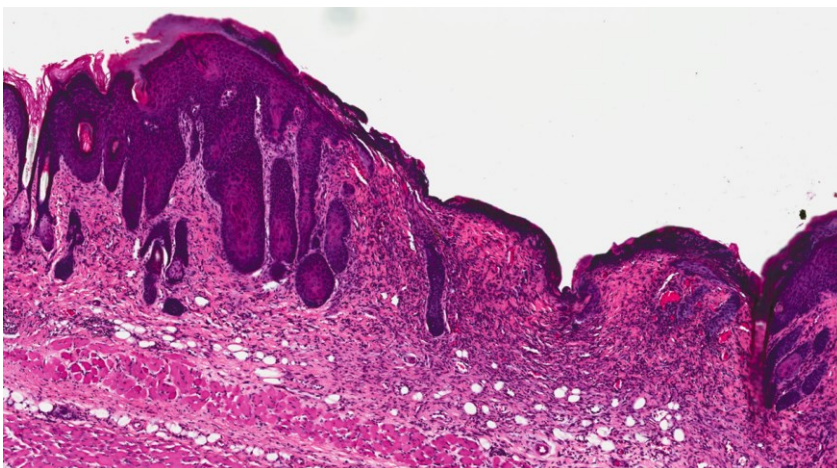
7. vuorokauden kohdalla villityyppi ja KO ryhmät eivät eronneet toisistaan granulaatiokudoksen koon suhteen tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,434$). 10. vuorokauden kohdalla kolme ryhmää erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p<0,001$), mutta ainoastaan verrattaessa revenneiden haavojen ryhmää WT ja LysMCreC ryhmiin ($p<0,001$ ja $p<0,001$). Myös 14. vuorokauden kohdalla ryhmät erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($p<0,001$). Revennyt LysMCreRe-R ryhmä poikkesi sekä WT että LysMCreC ryhmistä merkitsevästi ($p<0,001$ ja $p<0,001$).



Kuva 6. Haavojen granulaatiokudoksen kokojen ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$) keskiarvot eri tarkasteluryhmissä eri ajankohtina (päivä). *** = $p<0,001$



Kuva 7. Eri ryhmien värjättyjä haavaleikkeitä



Kuva 8. Suurempi mikroskooppikuva yllä olevasta revenneen haavan kudoksenäytteestä (LysMCreRe-R)

POHDINTA

Haavat paranivat genotyypistä riippumatta kaikilla histologisesti arvioiduilla parametreilla yhtä nopeasti, mutta furiinipoistogeenisten hiirten haavat saattoivat revetä tarkastelujakson loppupuolella. Nämä revenneet haavat erosivat kahdesta muusta tarkasteluryhmästä paranemiskyvyltään. Samoin haavat paranivat molemmilla genotyypeillä valokuvista määritettynä yhtä nopeasti. Valokuvista todettuna kaksi villityypin haavaa parani poikkeavasti ja yksi KO-ryhmän haava parani poikkeavasti. Tarkoittaako tämä samaa kuin histologisesti määritetyistä haavoista todettu repeäminen, on vaikea sanoa, koska valokuvista ei voi arvioida onko haava täysin re-epitelisoitunut eli onko haavalle muodostunut uusi pintasolukko. Valokuvista voi arvioida pelkkää haavan kokoa ja sen muotoa.

Tutkimuksessamme havaitsimme, että furiinipoistogeenisten hiirten haavat paranevat yhtä nopeasti kuin villityypin hiirten haavat, mutta furiinipoistogeenisten hiirten haavat saattavat kuitenkin spontaanisti revetä paranemisvaiheen aikana, mutta verrattain myöhään. Voisiko olla niin, että TGF- β tai jokin muu haavan paranemiseen vaikuttava furiini-riippuvainen makrofagi/neutrofiilien erittämä proteiini ei proteolyttisesti aktivoitu, mikä johtaisi siihen, että arvesta ei tule riittävän luja biomekaanisesti. Tämä täytyy selvittää jatkotutkimuksissa. Furiinin tärkeimpiä tehtäviä on kuitenkin TGF- β :n aktivointi (20). Kun furiinia ei ole haava-alueella käytettävissä, ei pro-TGF- β aktivoitu, jolloin haavaan ei muodostu vaurioitunutta kudosta korvaavaa ja sitä tukevaa uutta sidekudosta tarpeeksi, mikä johtaa repeämiseen biomekaanisen lujuuden riittämättömyyden vuoksi.

Furiinia tuotetaan laajasti eri kudoksissa, mutta mielenkiintoista olisi nähdä, mitkä solut sitä tuottavat ja kuinka paljon. Tutkimuksessamme käsiteltiin vain hiiriä, joilta furiini oli poistettu käytöstä luuydinperäisistä neutrofiileista ja makrofageista, jotka ovat erilaistuneita monosyyttejä. Monosyytit tuotetaan punaisessa luuytimessä, josta ne siirtyvät verenkiertoon ja verenkierrasta kudokseen siirtyessään monosyytit erilaistuvat makrofageiksi. Kun makrofagit hakeutuvat vaurioituneen kudoksen luokse ne tuovat sisältämänsä furiinin mukanaan. Tutkimuksessamme vain

tämä makrofagien ja neutrofiilien furiini oli poistettu. Furiini on osittain solun ulkoinen, liukoinen proteiini, joten on mahdollista, että muiden solujen tuottama furiini voi korvata makrofageista puuttuvan furiinin. Vähätupa ym. 2017 (22) havaitsivat tutkimuksessaan, että täysin vastaavien furiinipoistogeenisten hiirten hapenpuutteesta johtuva uudisverisuonten muodostus verkkokalvolla häiriintyi ja oli vähäisempää kuin villityypin hiirten. Furiinin pilkkomien entsyymien esiasteiden joukkoon kuuluu myös verisuonten uudismuodostukseen vaikuttavan VEGF-C-proteiinin (vascular endothelial growth factor-C) aktivoiminen (23). Tämä voi vaikuttaa myös ihohaavan paranemisessa, koska jos uudisverisuonia ei muodostu tarpeeksi, ei vaurioalueelle välttämättä saada riittävästi ravinteita ja hapetta uuden kudoksen muodostamiseen.

Tärkeää olisi myös selvittää, milloin furiinia on haavassa. Mahdollisesti paranemisen eri vaiheissa furiinia vaaditaan eri tavoin kudoksen oikeanlaisen paranemisen saavuttamiseksi. Kudoksissa on makrofageja jo valmiiksi, mutta suurin osa niistä tulee paikalle vasta vaurion jälkeen.

Tutkimuksessamme furiinipoistogeeniset haavat repesivät seurantajakson loppupuolella.

Puolivälissä seurantajaksoa eli 7. leikkauksen jälkeisen päivän kohdalla revenneitä haavoja ei ollut kummassakaan tarkasteluryhmässä. Repeämät havaittiin 10. leikkauksen jälkeisenä päivänä ja repeämien määrä kasvoi 14:een päivään mennessä. Furiinia ei välttämättä tarvita vielä ensimmäisen viikon aikana haava-alueella, mutta tulostemme perusteella tätä myöhemmin sen puute makrofageissa/granulosyyteissä haittaa paranemista, ja johtaa sen kohonneeseen repeämisherkkyyteen.

PCSK-entsyymiperheeseen kuuluu yhdeksän proproteiinikonvertaasia ja ne kaikki pilkkovat ja muuntavat omia kohdeproteiineja esiasteistaan biologisesti aktiiviseen muotoon katalysoimalla endoproteolyttistä katkaisua tunnistamastaan kohdeproteiinin kohdasta, joka koostuu tavallisista aminohapoista, arginiinista ja lysiinistä (24). Furiinin kaltaisia proproteiinikonvertaaseja on muitakin, joista esimerkiksi PCSK7 voi pilkkoa ja aktivoida pro-TGF- β 1:tä. Dubois ym. 2001 (25) havaitsivat tutkimuksessaan, että muut PCSK-perheen entsyymit eivät pysty täysin korvaamaan furiinia pro-TGF- β 1:n aktivoimisessa, mutta voivat kuitenkin täydentää tai osittain korvata furiinin tässä tehtävässä. Vaikka tutkimuksessamme makrofagien ja granulosyyttien furiini on poistettu, biologisesti aktiivista TGF- β 1:tä voi haava-alueella silti olettaa olevan jonkin verran muiden PCSK-perheen entsyymien vuoksi.

LÄHDELUETTELO

1. Colwell, A. S., Longaker, M. T. & Lorenz, H. P. Fetal wound healing. *Front. Biosci.* 2003. 8, 1240–1248
2. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008. 453, 314–321
3. Shaw, T. J., Martin, P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009. 122, 3209–3213
4. Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., Anitua, E. Platelets and wound healing. *Front. Biosci.* 2008. 13, 3532–3548
5. Bahou, W. F., Gnatenko, D. V. Platelet transcriptome: the application of microarray analysis to platelets. *Semin. Thromb. Hemost.* 2004. 30, 473–484
6. Yukami, T., Hasegawa, M., Matsushita, Y., Fujita, T., Matsushita, T., Horikawa, M., Komura, K., Yanaba, K., Hamaguchi, Y., Nagaoka, T. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. *J. Leukoc. Biol.* 2007. 82, 519–531
7. Tonnesen, M. G., Feng, X., Clark, R. A. Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2000. 5, 40–46
8. Martin, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997. 276, 75–81
9. Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R. J., Cotsarelis, G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* 2005. 11, 1351–1354
10. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* 2007. 127, 526–537
11. Kingsley, D. M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994. 8, 133–146
12. Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Goeddel, D. V. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature.* 1985. 316, 701–705
13. Madisen, L., Webb, N. R., Rose, T. M., Marquardt, H., Ikeda, T., Twardzik, D., Seyedin, S., Purchio, A. F. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA.* 1988. 7, 1–8
14. Letterio, J. J., Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998. 16, 137–161
15. Clark, D. A., Coker, R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998. 30, 293–298
16. Wahl, S. M. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol.* 1992. 12, 61–74
17. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R.,

- Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annuzziata, N., Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992. 359, 693–699
18. Taylor N. A., Van De Ven W. J., Creemers J. W. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J*. 2003. 17, 1215–1227
 19. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. 3, 753–766
 20. Pesu, M., Watford, W. T., Wei, L., Xu, L., Fuss, I., Strober, W., Andersson, J., Shevach, E. M., Quezado, M., Bouladoux, N., Roebroek, A., Belkaid, Y., Creemers, J., O'Shea, J. J. T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature*. 2008. 455, 246–250
 21. Cordova, Z. M., Grönholm, A., Kytölä, V., Taverniti, V., Hämäläinen, S., Aittomäki, S., Niininen, W., Junttila, I., Ylipää, A., Nykter, M., Pesu, M. Myeloid cell expressed proprotein convertase *FURIN* attenuates inflammation. *Oncotarget*. 2016. 7, 54392–54404
 22. Vähätupa, M., Cordova, Z. M., Barker, H., Aittomäki, S., Uusitalo, H., Järvinen, T. A. H., Pesu, M., Uusitalo-Järvinen, H. Furin deficiency in myeloid cells leads to attenuated revascularization in a mouse-model of oxygen-induced retinopathy. *Exp. Eye Res*. 2017. 166, 160–167
 23. Siegfried, G., Khatib, A. M., Benjannet, S., Chretien, M., Seidah, N. G. The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR(86) by members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity. *Cancer Res*. 2003. 63, 1458–1463.
 24. Turpeinen, H., Ortutay, Z., Pesu, M. Genetics of the first seven proprotein convertase enzymes in health and disease. *Curr. Genomics*. 2013. 14, 453–467.
 25. Dubois, C. M., Blanchette, F., Laprise, M-H., Leduc, R., Grondin, F., Seidah, N. G. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor- β 1-converting enzyme. *Am J Pathol*. 2001. 158, 305–316